

## **Biologiczne znaczenie lokalnych zmian w trójwymiarowej strukturze chromatyny wywołanych replikacją DNA.**

Genom ludzki składa się z długiego na 2 metry DNA, podzielonego na 46 różnej długości chromosomów, które musi się zmieścić do jądra komórkowego o średnicy około 10  $\mu\text{M}$ , czyli ~ 200 tysięcy razy mniejszej. Ta wielka dysproporcja rozmiarów powoduje, że genom w interfazowym jądrze musi być upakowany w bardzo uporządkowany sposób. Poza tym, że DNA jest mocno upakowane, równocześnie musi być łatwo dostępne dla kompleksów enzymatycznych uczestniczących m.in. w transkrypcji informacji genetycznej oraz jej kopiowaniu. Intrygujący problem badawczy - w jaki sposób komórki radzą sobie, żeby spełnić te dwa przeciwstawne wymagania - jest od lat przedmiotem intensywnych badań. Zaburzenia odpowiedniej organizacji genomu mogą prowadzić do błędnej regulacji ekspresji genów, replikacji DNA a w dalszej kolejności poważnych zaburzeń rozwojowych oraz chorób włączając raka.

Replikacja, czyli kopiowanie DNA, to bardzo złożony proces, w trakcie którego przy udziale szeregu kompleksów białkowych DNA jest rozplatanie a komplementarna nić jest syntetyzowana jednocześnie na obu niciach macierzystych. Aby to umożliwić maszyna replikacyjna musi mieć dostęp do DNA – a co za tym idzie w wielu wypadkach lokalna struktura chromatyny musi ulec istotnym zmianom. Co ciekawe, replikacja DNA jest zlokalizowana w stosunkowo niewielkiej liczbie centrów replikacyjnych zwanych fabrykami replikacyjnymi. Uważa się, że większość fabryk zawiera kilka kompleksów replikacyjnych i replikuje około 1 miliona par zasad DNA. Dokładna struktura i biologiczne znaczenie fabryk replikacyjnych jest nieznane.

**Mój projekt ma na celu opisać fabryki replikacyjne oraz ich znaczenie dla organizacji genomu, a także rolę w rozwoju raka.** Planuję zrobić to w kompleksowy sposób łącząc cało-genomowe metody mapowania z użyciem sekwencjonowania DNA nowej generacji z połączonymi z trójwymiarową mikroskopią.

Poziomy organizacji pomiędzy upakowaniem DNA na nukleosomach a uformowaniem chromatyny w terytoria chromosomowe były do niedawna mało zbadane. Przez ostatnie 9 lat dokonał się bezprecedensowy postęp w tym obszarze, dzięki Hi-C: metodzie, która umożliwia kompleksowy wgląd w trójwymiarową organizację chromatyny na wszystkich poziomach poprzez zmapowanie interakcji pomiędzy poszczególnymi fragmentami chromatyny na genomową skalę. Jednym z pierwszych odkryć dokonanych przy pomocy Hi-C była obserwacja, że cały genom jest podzielony na pod-domeny o zwiększonej częstości interakcji o rozmiarach ok 1 Mbp. Dalsza komputerowa analiza Hi-C w połączeniu z korelacją z innymi danymi genomowymi pozwoliła ustalić, że domeny te można podzielić na dwa typy A i B, oraz, że domeny tego samego typu kontaktują się ze sobą preferencyjnie w obrębie nie tylko tego samego chromosomu, ale i całego genomu.

Postępy w opisie i rozumieniu organizacji trójwymiarowej genomu oraz zainteresowanie intrygującą czasoprzestrzenną organizacją jego replikacji (fabryki replikacyjne) skłoniły mnie do podjęcia wstępnych badań nad wyjaśnianiem wpływu replikacji DNA na strukturę chromatyny. Wiadomo, że błędy w replikacji mogą prowadzić do rozwoju raka, np. poprzez translokacje chromosomowe. Dlatego postanowiłem zbadać także wpływ lokalnej trójwymiarowej struktury chromatyny na powstawanie translokacji, charakterystycznych dla znanych nowotworów.

**Aby odpowiedzieć na nurtujące mnie pytania opracowałem niedawno zmodyfikowaną wersję Hi-C, która selektywnie mierzy częstość interakcji wyłącznie tej frakcji DNA, które aktualnie jest kopiowana w fabrykach replikacyjnych.** Nazwałem tę nową rodzinę metod RepliC (cało-genomowa wersja), oraz Repli3C i RepliCaptureC (wersje analizujące interakcje lokalnie). Repli3C umożliwia wykrywanie interakcji specyficznych dla replikacji DNA przy pomocy stosunkowo prostej i taniej metody qPCR, więc idealnie nadawało się do przetestowania nowej metodologii. Na podstawie porównawczej analizy bioinformatycznej eksperymentów 4C zrobionych na dzielących się oraz nieaktywnych replikacyjnie limfocytach wybrałem miejsca, które sugerowały zmiany w lokalnej konformacji i przetestowałem je przy pomocy Repli3C. **Okazało się, że Repli3C w bardzo jasny sposób potwierdziło analizę bioinformatyczną.**

Zachęciło mnie to do ubiegania się o finansowanie potrzebne do przeprowadzania dalszych kompleksowych badań nad wpływem fabryk replikacyjnych na strukturę chromatyny oraz ryzyko powstawania rakotwórczych translokacji.